Journal of Plant Protection
Vol. 35, No. 1, Spring 2021, P. 1-10

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، ص. ۱۰-۱

مقاله پژوهشی

شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی فوزاریوم‌های (*Fusarium* spp.) اِندوفیت ریشه جودره (*Hordeum spontaneum*) و شلمی (*Rapistrum rugosum*)

فرشید نورالوندی[۱]- حسن علیزاده[۲]*- حسین صارمی[۳]- غلامرضا صالحی جوزانی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۱

چکیده

اندوفیت‌ها میکروارگانیسم‌های درون بافت‌های گیاهی هستند و اغلب بدون اینکه علایم بیماری قابل مشاهده‌ای را بروز دهند، برهمکنش‌های مختلفی با میزبان خود دارند. در این تحقیق، فوزاریوم‌های اندوفیت ریشه جودره (*Hordeum spontaneum*) و شلمی (*Rapistrum rugosum*) ارزیابی شدند. برای این منظور بذر علف‌های هرز بیان شده روی خاک مزارع گندم نمونه‌برداری شده از استان‌های البرز، تهران، خراسان رضوی، خراسان شمالی، خوزستان، فارس، قزوین،کرمانشاه و گلستان در شرایط گلخانه درون گلدان کشت شدند. گیاهان در مرحله ۶-۵ برگی برداشت شده و ریشه‌ها پس از قطع شدن از محل طوقه، در تکه‌های کوچک روی محیط کشت اختصاصی فوزاریوم، پنتاکلرو نیترو بنزن پپتون آگار کشت داده شد. جدایه‌ها پس از خالص‌سازی براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و توالی ژن *TEF 1-α* شناسایی شدند. قارچ *Fusarium equiseti* گونه غالب در اکثر مناطق بود که از هر دو گونه علف‌هرز جداسازی شد. به علاوه قارچ‌های *F. redolens* و *F. acutatum* فقط از جودره و *F. oxysporum* و *F. torulosum* فقط از شلمی جداسازی شدند. آگاهی از طیف میکروبی اندوفیت علف‌های هرز، می‌تواند در درک بهتر برهمکنش‌های میان علف هرز-میکروارگانیسم‌ها کمک کرده و حتی ممکن است فرصت‌هایی در جهت بهره‌برداری از این عوامل در برنامه‌های کنترل زیستی فراهم نماید.

واژه‌های کلیدی: قارچ، علف‌هرز، گندم، *TEF*، *Fusarium equiseti*

مقدمه

علف‌های هرز یکی از مهمترین عوامل خسارت‌زا بر اکوسیستم‌های زراعی هستند. این گیاهان با محیط اطراف خود در ارتباط بوده و یکی از مهمترین اجزایی که با آن برهمکنش دارند اکوسیستم خاک است (۲۹). در این رابطه میکروارگانیسم‌های موجود در منطقه رایزوسفر، گروهی بسیار مهم از عوامل زنده خاک هستند که در پیوند بسیار نزدیک با ریشه علف‌های هرز و سایر گیاهان قرار دارند. در واقع رایزوسفر منطقه‌ای است که در مجاورت ریشه بوده، از آن تأثیر پذیرفته و جمعیت بسیار بالایی از میکروارگانیسم‌ها در آن وجود دارد (۲۲).

علف‌های هرز و میکروارگانیسم‌های موجود در ریزوسفر آنها ارتباط بسیار نزدیک و تنگاتنگی دارند. مشخص شده است که تنوع گونه‌های گیاهی موجود در یک مرغزار بر ترکیب و تنوع گونه‌ای میکروارگانیسم‌های آن کاملا تأثیرگذار بوده است (۴۵). ارتباط میان علف‌های هرز و میکروارگانیسم‌های خاک بسیار پیچیده و متنوع بوده و این اجزاء اکوسیستم در سطوح متفاوتی از ارتباط با یکدیگر قرار دارند؛ از پرگنه‌سازهای سطح ریشه گرفته تا برهمکنش‌های اندوفیتی. این روابط می‌تواند شامل پیوندهای سودمند دو طرفه و یا زیان‌آور باشد (۱۵).

نخستین قدم در مطالعه روابط میان علف‌های هرز و میکروارگانیسم‌های همراه آنها، آگاهی از این مسأله است که اساسا گیاه با کدام یک از آنها در ارتباط است. چنین مطالعاتی در درک بهتر نحوه تعامل یک علف هرز با محیط اطراف خود بسیار مفید است (۳). علاوه بر این، آگاهی از این مسأله در طراحی روش‌های کارآمدتر مدیریت علف‌های هرز یاری رسان است. در حقیقت علف‌کش‌ها در

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش آموخته مقطع دکتری رشته علوم علف‌های‌هرز و استاد گروه زراعت و اصلاح و نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(*-نویسنده مسئول: Email: malizade@ut.ac.ir)
۳- استاد گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۴- استاد، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

DOI: 10.22067/JPP.2021.32395.0

حال حاضر مهمترین و مؤثرترین ابزار مدیریت علف‌های هرز در ایران و جهان بوده (۱۴ و ۴۶) و اثرات نـامطلوب آنهـا بـر سـلامت انسـان، محیط زیست و بروز پدیده مقاومت در علف‌های هرز بر کسی پوشیده نیست. براین اساس علاقـه‌منـدی‌هـا در راسـتای حرکـت بـه سـمت مـدیریت غیرشـیمیایی علـف‌هـای هـرز رو بـه افـزایش اسـت (۲۰). مطالعات مختلفی وجود دارد که در آنها از میکروارگانیسم‌های اندوفیت ریشه علف‌های هرز برای کنترل زیستی آنها بهره گرفتـه شـده اسـت (۱۹ و ۱۶). چنـین مطالعـاتی در رابطـه بـا امکـان بهـره‌گیـری از میکروارگانیسم‌های رایزوسفر به عنوان عامل کنترل زیستی علف‌های هرز الهام بخش هستند.

اتخاذ روش‌های کنترل زیسـتی در مـورد علـف‌هـای هـرز تیـره گندمیان (Poaceae) که به دلیل قرابت زیاد فیزیولوژیـک بـا گنـدم و جو و همچنین استعداد بالای بروز مقاومت در برابر علـف‌کـش‌هـا، بـا محدودیت علف‌کش اختصاصی مواجه هستند بسیار مفید ارزیابی شده است (۴۳). برای مثال در حال حاضر در کشـور مـا کنتـرل شـیمیایی علف‌های هـرزی ماننـد جـو دره (*Hordeum spontaneum* koch)، چچم (*Lolium* spp.)، چاودار (*Secale cereale* L.)، یولاف وحشی (*Avena* spp.) و ... با چالش‌های عدیده‌ای روبـرو اسـت (۳۰ و ۳۷). همچنین، شلمی (*Rapistrum rugosum* L.) از علف‌های هرز مهـم مزارع گندم کشور و از خـانواده شـب‌بـو (Brassicaceae) اسـت کـه گزارش بیوتیپ مقاوم آن نسبت به علف‌کش وجود دارد (۱۳).

کنترل زیستی علف‌های هرز به عنوان رهیافتی مهم و امیـدبخش در روش‌های مدیریت تلفیقی علف‌های هرز مطرح است (۸)، اما ایـن رهیافت برای مؤثر واقع شدن نیازمند در اختیار داشـتن ابـزار مناسـب است. از حشرات و قارچ‌هـا بـه شـکل تجـاری بـرای کنتـرل برخـی گونـه‌هـای گیـاهی مـزاحم اسـتفاده شـده (۲۰) و سـابقه اسـتفاده از مایکوهربیسایدها به دهه هفتاد میلادی باز می‌گردد (۴). در این راستا، میکروارگانیسـم‌هـا ابـزاری بـالقوه مناسـب بـرای اجرایـی کـردن استراتژی‌های کنترل زیستی علف‌های هرز هستند (۳۶). برای مثـال، رایزوباکتری‌های زیان آور از جمله میکروارگانیسـم‌هـایی هسـتند کـه روی ریشه گیاهان پرگنه‌سازی کرده و موجب بـازداری از رشـد آنهـا می‌شوند (۳۸) و نقش آنها در این رابطه موضوع چندین مطالعـه بـوده اسـت (۲۳). در یـک مطالعـه در کـره جنـوبی، گونـه‌ای بـاکتری *Enterobacter* sp. شناسایی شد کـه بـه میـزان قابـل تـوجهی اثـر بازدارندگی روی گیاهچه‌های تربچه و کاهو نسبت به شاهد نشـان داد و امکان استفاده از این جدایه باکتریـایی بـه عنـوان یـک علـف‌کـش زیستی مناسب امیدبخش نشان داد (۳۶). همچنین، گونه‌های مختلف قارچ‌های منطقه رایزوسفر به عنوان عامـل کنتـرل زیسـتی مطالعـه و پیشنهاد شده‌اند (۱). همچنین برخی از قارچ‌های منطقه ریزوسفر مانند *Colletotrichum gloeosporioides*، *Aeschynomene virginica*، *Phomo chenopodicola* و *Exserohilum monoceras* به عنوان علف‌کش‌های زیستی جداسـازی و شناسـایی شده‌اند (۳۹).

سلسله قارچ‌ها شامل بیش از ۷۰ هزار گونه قارچ است، اما تمرکـز عمده در مطالعات برهکمنش گیاه-میکروارگانیسم‌هـا بیشـتر بـر روی رده آسکومیست‌ها بوده است، چرا که اغلب آن‌ها خاک‌زی و در تعامل با گیاهان هستند (۱۸). انواع گونه‌های فوزاریـوم در ایـن راسـته قـرار دارند و خاصیت بیماری‌زایی آن‌ها موضوع مطالعات زیادی بوده اسـت. در واقع این جنس به عنوان یکی از مهمترین گونـه‌هـای قـارچ قابـل استفاده در کنترل زیستی مطـرح اسـت (۱۹). اغلـب مطالعـات انجـام گرفته در زمینه استفاده از قارچ‌های جنس فوزاریوم معطوف بر کنتـرل زیستی علف‌های هـرز انگلـی بـوده اسـت. بـرای مثـال از قـارچ *F. oxysporum* برای کنترل زیستی گل جـالیز (*Orobanche* spp.) و علف جارو (*Striga* spp.) استفاده شده است (۳۲ و ۳۵).

متاسفانه اطلاعات در رابطه با طیـف قـارچ‌هـای انـدوفیت ریشـه علف‌های‌هرز بسیار محدود است. به ویژه آنکه در کشور ما تقریبا هیچ مطالعه‌ای در این مورد انجـام نشـده اسـت. در نتیجـه هـدف از ایـن پژوهش شناسایی قارچ‌های فوزاریوم اندوفیت ریشه جو دره و شـلمی، به عنوان مسأله سازترین علف‌های‌هرز مزارع غلات کشور اسـت کـه گزارش‌های متعددی در رابطـه بـا عـدم کـارایی مناسـب بسـیاری از علف‌کش‌های موجود در بازار در کنترل آنها وجود دارد. این مطالعه در راسـتای افـزایش شـناخت مـا از فوزاریـوم‌هـای در ارتبـاط بـا ریشـه علف‌های‌هرز جودره و شلمی انجام شده است. انجام چنـین مطالعـاتی می‌تواند در یافتن عوامل کارامد و تخصصی کنترل زیستی گونـه‌هـای مسأله‌ساز علف‌های هرز به خصوص آن دسته که مستعد بروز مقاومت هستند و یا به سختی با علف‌کش‌ها کنترل می‌شوند، سودمند باشد.

مواد و روش‌ها

- جمع‌آوری خاک و بذر گونه‌های مورد بررسی

بذرهای جودره و شلمی از مزارع گندم استان‌هـای البـرز، تهـران، خراسان شمالی، خوزستان، قزوین، کرمانشاه و گلستان جمع‌آوری شد. همچنین، نمونه‌های خاک مزارع گندم از این استان‌ها تهیه شد. بـرای جمع‌آوری خاک مزارعی در نظر گرفته شد که زیر کشت گندم بودنـد. از هر استان ۵-۳ مزرعه در نقاط مختلف انتخاب شده و نمونه‌بـرداری از خاک از عمق ۳۰-۵ سانتی‌متر انجام شد. بذرهای جو دره و شـلمی جمع آوری شده ابتـدا در شـرایط آزمایشـگاهی و روی تشـتک پتـری جوانه‌دار شدند. سپس جوانه‌ها روی خاک اسـتان‌هـای مختلـف درون گلدان‌هایی که در محیط گلخانه قرار داده شده بود کشت شدند. پـس از ۴۰-۳۰ روز و در مرحله ۶-۵ برگی، گیاه با دقـت از خـاک خـارج و ریشه‌ها از محل طوقه از برگ‌ها جدا شدند.

- جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های فوزاریوم

ریشه‌ها کاملا با آب شسته شده و برای ضـدعفـونی سـطحی بـه ترتیب در الکل ۷۰ درصد، هیپوکلریت سـدیم ۱٪ و مجـددا الکـل ۷۰

درصد و هر بار به مدت ۴۵-۳۰ ثانیه غوطه‌ور شده و در نهایت سه مرتبه به وسیله آب مقطر سترون شسته شدند. این زمان براین اساس انتخاب شد که طولانی‌ترین زمانی بود که نه تنها آلودگی‌های با منشأ ساپروفیتی روی محیط کشت منتقل نمی‌شدند، بلکه ریشه‌ها نیز آسیب ندیده و میکروارگانیسم‌های اندوفیت آنها همچنان رشد می‌کردند. در واقع در زمان‌های طولانی‌تر از آن به دلیل بافت ضعیف و نازک ریشه گیاهچه‌های جوان (به ویژه در مورد شلمی) دیگر هیچ گونه قارچی روی محیط دیده نمی‌شد.

پس از ضد عفونی ریشه‌ها به قطعات به طول حدود یک سانتی‌متر برش داده شده و روی محیط کشت اختصاصی فوزاریوم، پنتاکلرو نیتروبنزن پپتون-آگار[1] (PPA) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از ۷۲ ساعت و شروع رشد قارچ از داخل ریشه روی محیط کشت، قسمتی از میسلیوم آن برداشته شده و به محیط کشت آب-آگار[2](WA) برای نوک ریسه کردن منتقل شد. بسته به سرعت رشد هر جدایه روی این محیط پس از ۷۲-۲۴ ساعت، نوک ریسه تهیه شده و به محیط سیب‌زمینی دکستروز-آگار[3](PDA) منتقل شد. به این ترتیب جدایه‌ها جداسازی و خالص شدند.

-شناسایی مورفولوژیک جدایه‌های فوزاریوم

جدایه‌های خالص شده برای شناسایی به محیط‌های کشت PDA، آگار مغذی شده مصنوعی[4] (SNA) و محیط برگ میخک آگار[5] (CLA) منتقل شده و مشخصات پرگنه و ویژگی‌های میکروسکوپی آنها روی هر کدام از محیط‌های کشت یاد شده، ارزیابی شد. مشخصات و ویژگی‌های ارزیابی شده عبارت بودند از: رنگ و قطر پرگنه در محیط PDA، وجود و عدم وجود اسپورودوکیوم و ماکروکنیدی و خصوصیات ظاهری آنها، وجود و یا عدم وجود میکروکنیدی و خصوصیات ظاهری آن (تعداد سلول، شکل گرزی یا سیلندری و ...)، وجود یا عدم وجود فیالیدها، کلامیدوسپور و شکل ظاهری آن روی محیط‌های CLA و SNA. این ویژگی‌ها در جدول مربوطه که برای شناسایی جدایه‌ها در نظر گرفته شده بود ثبت شده و در نهایت شناسایی مورفولوژیک با استفاده از منابع معتبر انجام شد (۲۴).

-شناسایی مولکولی جدایه‌های فوزاریوم و آنالیز فیلوژنی

به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌ها، تکثیر و توالی یابی ژن *TEF* انجام شد. برای استخراج DNA ژنومی قارچ، از روش ژانگ و استفنسون (۴۷) با اعمال اندکی تغییرات استفاده شد. برای تهیه میسلیوم، قارچ روی محیط کشت PDA به مدت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد. بعد از رشد کافی پرگنه قارچ، بافت آن با استفاده از اسکالپل سترون از روی محیط کشت درون تشتک خراش داده و مستقیما به داخل هاون‌های چینی سترون منتقل شد. از این میسلیوم‌ها برای استخراج DNA استفاده شد. به منظور ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، از ژل آگارز ۰/۸ درصد و دستگاه نانودارپ (Implen Inc.1000) استفاده شد.

تکثیر و توالی‌یابی ژن *TEF* با استفاده از آغازگرهای EF1-T (5´ATGGGTAAGGAGGACAAGAC) و EF2T (5´GGAAGTACCAGTGATCATGTT) انجام شد (۱۲). پس از قرار دادن میکروتیوب های ۰/۲ میلی‌لیتری در دستگاه ترموسایکلر، برنامه حرارتی به منظور تکثیر DNA در ۳۵ چرخه (مراحل واسرشت‌سازی، اتصال آغازگر و بسط) به صورتی که در جدول یک ارایه شده است تنظیم شد. محصولات تکثیرشده، برای خالص‌سازی و تعیین‌توالی نوکلئوتیدی به یک شرکت معتبر در این زمینه در کشور کره جنوبی فرستاده شد.

ویرایش و مشابهت‌سازی توالی‌ها به این صورت انجام شد که بعد از دریافت فایل قطعات تعیین توالی شده، کروماتوگرام مربوط به توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chromas Pro نسخه 1.7.6 و نرم‌افزار Editseq نسخه 5.01 مشاهده، ویرایش و در بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) مشابهت‌یابی شدند (۲ و ۳۴).

برای مرتب‌سازی توالی‌ها، توالی‌های منتخب مورد بررسی همراه با توالی‌های اخذ شده از بانک ژن، به نرم‌افزار Clustal X نسخه2.1 تحت سیستم عامل ویندوز وارد گردید و متعاقباً مرتب‌سازی[6] شدند (۴۲). توالی‌های مرتب شده به‌دقت به‌صورت چشمی رویت و در صورت نیاز تغییرات اندکی در آن‌ها ایجاد گردید.

برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی داده‌ها و ترسیم تبارنمای آن‌ها، نوکلئوتیدی متعلق به جدایه‌های مورد بررسی و ترسیم تبارنمای فیلوژنتیکی آن‌ها، از نرم‌افزار (MEGA6 (molecular evolutionary genetics analysis تحت سیستم عامل ویندوز استفاده شد (۴۱). برای ارزیابی توالی‌ها، گروه خارجی مناسب انتخاب شد. در نهایت برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و ارزیابی توالی نوکلوتیدی نواحی ژنی جدایه‌های مختلف و ترسیم تبار نمای آن‌ها از روش Maximum Composite Likelihood (۴۰) از الگوی از پیش تعیین شده (default) نرم‌افزار MEGA6 استفاده گردید. در طی تجزیه و تحلیل با این روش، هیچ یک از صفات حذف نگردیدند. برای اطمینان از ثبات شاخه های موجود در این شجره نیز، تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار انجام گردید.

1- Penta chloro nitrobenzene peptone agar
2- Water agar
3- Potato dextrose agar
4- Synthetic nutrient-poor agar
5- Carnation leaf agar
6- Alignment

جدول ۱- برنامه حرارتی PCR جهت تکثیر قطعات DNA با آغازگرهای ژن *TEF*

Table 1- PCR thermal program for DNA replication with *TEF* gene primers

شرایط (Condition)	مرحله (Step)
95 ˚C for 5 min	شروع واسرشت شدن (Initial denaturation)
94 ˚C for 50 sec	واسرشت شدن (Denaturation)
57 ˚C for 50 sec	مرحله اتصال (Annealing)
72 ˚C for 60 sec	مرحله بسط و طویل شدن (Extension)
72 ˚C for 7 min	مرحله طویل شدن نهایی (Final extension)

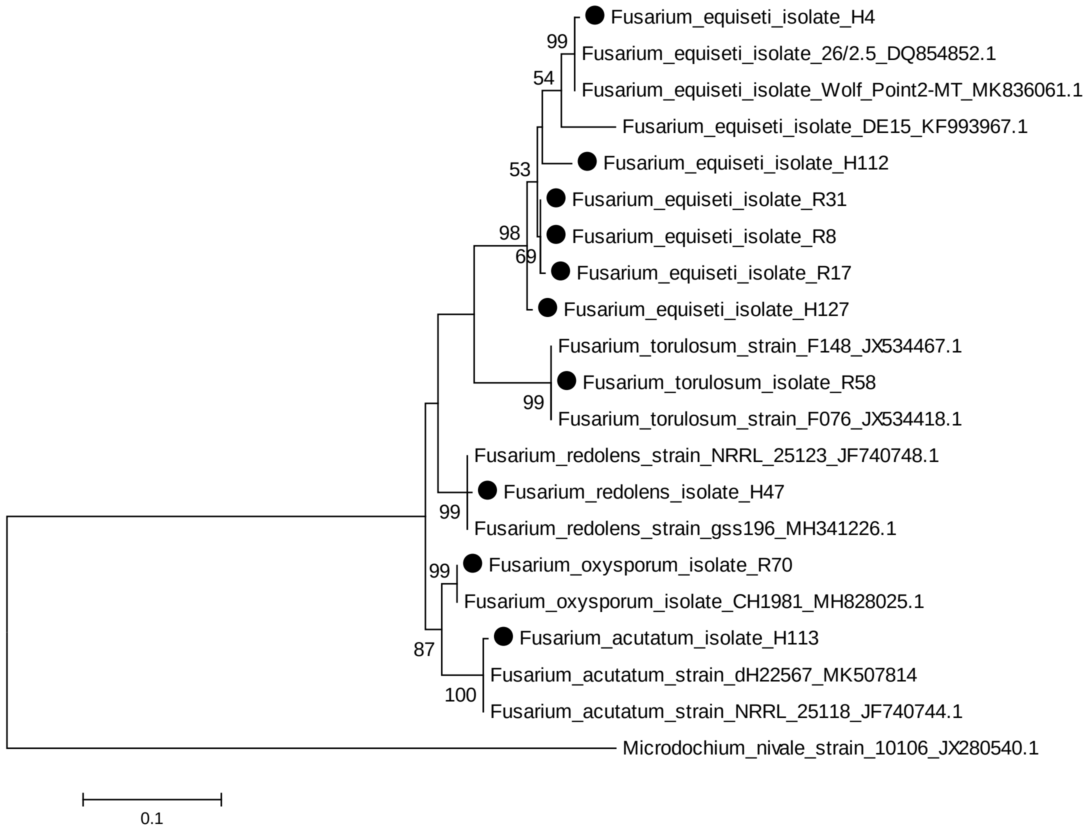
نتایج و بحث

گونه‌های بدست آمده با حمایت زیاد از یکدیگر تفکیک گردیدند و در کنار جدایه‌های اخذ شده از بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) قرار گرفتند. نتایج بدست آمده، شناسایی ریخت شناختی انجام شده را تایید نمود (شکل ۱). بر این اساس گونه‌های مختلف فوزاریوم از ریشه علف‌هرز جودره کشت شده در خاک‌های نمونه‌برداری شده از مناطق مختلف شناسایی شد. *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. بیشترین فراوانی را نشان داده و از ریشه این علف هرز کشت شده در خاک استان‌های فارس، گلستان و خوزستان جداسازی شد (جدول ۲). به علاوه، گونه‌های *F. redolens* Wollenw.، و Nirenberg & O'Donnell *F. acutatum* به ترتیب از ریشه جودره کشت شده بر روی خاک‌های خراسان شمالی و قزوین جداسازی و شناسایی شدند.

قارچ *F. equiseti* قبلا نیز از برخی گیاهان تیره گندمیان جداسازی و مشخص شده است که این گونه از تمایل بیشتری برای همزیستی با ریشه برخی گیاهان این تیره برخوردار است (۲۶ و ۲۷). این قارچ معمولا به عنوان یک ساپروفیت و مهاجم ثانویه شناخته می‌شود (۲۴) اما نتایج برخی از مطالعات نشان داده است که می‌تواند به عنوان یک عامل کنترل اختصاصی برای کنترل زیستی علف‌های‌هرز نیز مطرح باشد (۵ و ۳۱). به علاوه، در گذشته نیز *F. redolens* و *F. oxysporum* از علف‌های هرز *Coix lacryma-jobi* (۱۷) و علف‌باغ *Dactylis glomerata* (L.) D.C. (۲۸) جداسازی شده‌اند که این گونه‌ها نیز متعلق به تیره گندمیان می‌باشند. به نظر می‌رسد گونه‌های خاصی از جنس فوزاریوم وابستگی بیشتری برای ارتباط و همزیستی با گونه‌های خاصی از علف‌های هرز داشته باشند.

چندین گونه مختلف فوزاریوم نیز از ریشه شلمی کشت شده روی خاک مناطق مختلف جداسازی و شناسایی شد. *F. equiseti* در مورد شلمی از نیز بیشترین فراوانی برخوردار بوده و از ریشه این علف‌هرز کشت شده روی خاک استان‌های فارس، قزوین و گرگان جداسازی و شناسایی شد (جدول ۲). همچنین (Berk. & M.A. Curtis) *F. torulosum* Gruyter & J.H.M. Schneid و *F. oxysporum* نیز از ریشه شلمی کشت شده روی خاک استان‌های کرمانشاه و تهران جداسازی و شناسایی شدند. در گذشته نیز *F. oxysporum* به عنوان یک اندوفیت از میزبان‌هایی متعلق به خانواده شب‌بو مانند منداب (*Eruca sativa* Mill.)، *Matthiola* (L.) W.T. Aiton *incana* و *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. جداسازی و شناسایی شده است (۱۱ و ۲۵). همچنین قارچ *F. torulosum* برای اولین بار در ایران از گل آذین چند گونه از علف‌های هرز خانواده گرامینه جداسازی و شناسایی شده است (۹).

در این پژوهش، چندین گونه فوزاریوم از دو میزبان علف هرز مهم مزارع گندم جداسازی و شناسایی شد. جالب توجه است که گونه‌های مختلفی از فوزاریوم در سراسر جهان به عنوان عوامل کنترل زیستی علف‌های هرز معرفی شده‌اند. برخی از این موارد عبارتند از: *F. tumidum* Sherb. برای *Cytisus scoparius* (L.) Link و L. *Ulex europaeus* در زلاند نو (۱۰)، *F. oxysporum* برای گل جالیز (*Orobanche* spp.) و *F. nygamai* L.W. Burgess & Trimboli برای استریگا [*Striga hermonthica* (Delile) Benth.] در سودان و آلمان (۲۱)، *F. oxysporum* و *F. semitectum* var. majus Wollenw. علیه سترایگا در غرب آفریقا و کانادا (۷) و *Fusarium* spp. برای کنترل نوعی فرفیون (*Euphorbia esula* L.) در آمریکا (۶) و برای *Egeria densa* Planch. و *E. najas* Planch. در برزیل (۳۳). به نظر می‌رسد چنین مطالعاتی در قدم اول با معرفی فوزاریوم‌های اندوفیت در ارتباط با ریشه علف‌های هرز، می‌تواند مسیر را در جهت یافتن سویه‌های اختصاصی فوزاریوم به عنوان عوامل کنترل زیستی علف‌های هرز هموار سازد؛ چرا که برای یافتن چنین عواملی، در ابتدا نیاز به آگاهی از طیف میکروارگانیسم‌هایی است که با این گیاهان در ارتباط بوده و می‌توانند درون آنها پرگنه‌سازی کنند. چنین رهیافتی به وسیله برخی دیگر از محققین نیز مورد توجه بوده است (۷ و ۴۴).



شکل ۱- تبار نمای بدست آمده از روش ML بر اساس توالی ژن *TEF* در ۱۰ جدایه قارچ *Fusarium*. مقیاس نشان دهنده ۰/۰۱ جایگزینی به ازای هر نوکلئوتید می‌باشد و اعداد بالای شاخه ها، نتایج اعتبار سنجی را با ۱۰۰۰ تکرار نشان می‌دهند. علامت مثل توپر سیاه‌رنگ نشان دهنده جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق می‌باشد. جدایه‌ای از گونه *Microdochium nivale* به عنوان گروه خارجی قرار داده شده است. شماره دستیابی جدایه‌های اخذ شده در شکل در کنار نام جدایه آورده شده است.

Figure 1- Phylogenetic tree for 10 *Fusarium* isolates obtained with ML method based on *partial sequences of translation elongation factor (TEF-1_) gene*. The scale bar shows 0.01 substitutions per site and bootstrap supports values from 1000 replicates shown at node. Solid black circles in the figure indicate sequence data for isolates of the study. The tree was rooted to *Microdochium nivale* as outgroup. Accession numbers of the isolates are presented next to the isolate identification.

تمام گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق، برای نخستین بار در دنیا به عنوان قارچ‌های فوزاریوم اندوفیت ریشه از میزبان‌های جدید جو دره و شلمی معرفی شده‌اند. تنوع مشاهده شده در گونه‌های جداسازی شده بیانگر این حقیقت است که گونه‌های مختلفی از فوزاریوم و احتمالا سایر قارچ‌ها با ریشه این علف‌های هرز می‌توانند در ارتباط باشند. متاسفانه تا به امروز به خصوص در کشور ما این گونه از میکروارگانیسم‌ها کمتر مورد مطالعه و توجه قرار گرفته‌اند. در نتیجه اینکه به لحاظ سیستماتیک چه گونه‌هایی از آنها با علف‌های هرز مختلف در ارتباط هستند و به لحاظ کارکردی چه برهمکنش‌هایی با میزبان خود دارند تا حد قابل ملاحظه‌ای ناشناخته است.

شناخت این عوامل، به عنوان یکی از مهمترین میکروارگانیسم‌های استفاده شده در برنامه‌های کنترل زیستی، می‌تواند در درک برهمکنش‌های احتمالی میان گیاه و میکروارگانیسم‌های همراه آن و همچنین طرح‌ریزی برنامه‌های کنترل زیستی علف‌های هرز سودمند باشد. در اختیار داشتن ابزار متنوع و مناسب کنترل، در تکامل استراتژی‌های مدیریت چنین علف‌های هرز دردسرسازی یاری می‌رساند. در نهایت پیشنهاد می‌شود مطالعه‌ی روابط این گونه از قارچ‌ها با میزبان خود در جهت یافتن عامل کنترل زیستی مناسب مورد توجه بیشتری قرار بگیرد. در حقیقت می‌توان گفت منبع بزرگی از ابزار زیستی، به شکل بالقوه در دسترس قرار دارد که با توجه بیشتر به آنها، می‌توان به سمت تنوع بخشیدن به روش‌های مدیریت علف‌های هرز گام برداشت. چنین رهیافتی به ویژه در مورد علف‌های هرزی که با علف‌کش‌های موجود به خوبی کنترل نمی‌شوند و یا مستعد بروز مقاومت نسبت به علف‌کش‌ها هستند، مفید خواهد بود.

جدول ۲- گونه‌های فوزاریوم اندوفیت جداسازی و شناسازی شده از ریشه جودره (*Hordeum spontaneum*) و شلمی (*Rapistrum rugosum*) از مناطق مختلف ایران

Table 2- Endophytic *Fusarium* species isolated and identified from root of spontaneous barley (*Hordeum spontaneum*) and turnipweed (*Rapistrum rugosum*)

میزبان Host	جنس و گونه فوزاریوم Definition	منطقه Region	شماره دسترسی Accession number
جودره *Hordeum spontaneum*	*Fusarium redolens* isolate H47	خراسان شمالی (Shomali Khorasan)	MH401552
	Fusarium acutatum isolate H113	قزوین (Qazvin)	MH401553
	Fusarium equiseti isolate H127	گلستان (Golestan)	MH401555
	Fusarium equiseti isolate H112	خوزستان (Khouzestan)	MH401562
	Fusarium equiseti isolate H4	فارس (Fars)	MH260567
شلمی *Rapistrum rugosum*	*Fusarium equiseti* isolate R17	قزوین (Qazvin)	MH401556
	Fusarium equiseti isolate R31	فارس (Fars)	MH401557
	Fusarium equiseti isolate R8	گلستان (Golestan)	MH249606
	Fusarium torulosum isolate R58	کرمانشاه (Kermanshah)	MH401558
	Fusarium oxysporum isolate R70	تهران (Tehran)	MH401559

منابع

1- Ahluwalia A.D. 2007. Bioherbicides: an eco-friendly approach to weed management. Current Science 92: 10-11.

2- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389-3402.

3- Andrews M., Cripps, M.G., and Edwards G.R. 2012. The potential of beneficial microorganisms in agricultural systems. Annals of Applied Biology 160: 1-5.

4- Beest D.O., Yang X.B., and Cisar C.R. 1992. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. Annual Review of Phytopathology 30: 637-657.

5- Boari A., and Vurro M. 2004. Evaluation of *Fusarium* spp. and other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobanche ramosa*). Biological Control 30: 212-219.

6- Caesar A.J. 1999. Insect/pathogen interactions are the foundation of weed biocontrol. *In*: Program Abstracts, X International Symposium on Biological Control of Weeds, USDAARS and Montana State University, Bozeman, MT. Pp. 53.

7- Chandler D., Bailey A.S., Tatchell G.M., Davidson G., Greaves J., and Grant W.P. 2011. The development, regulation and use of bio-pesticides for integrated pest management. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 366: 1987-1998.

8- Ciotola M., Watson A.K., and Hallett S.G. 1995. Discovery of an isolate of *Fusarium oxysporum* with potential to control Striga hermonthica in Africa. Weed Research 35: 303-309.

9- Davari M., Babai-Ahari A., Arzanlou M., Zare R., D Van Diepeningen A., and De Hoog G.S. 2014. Morphological and molecular characterization of three new Fusarium species associated with inflorescence of wild grasses for Iran. Rostaniha 14: 124-134. (In Persian with English abstract)

10- Fröhlich J., Morin L., Gianotti A., and Webster R. 1999. Exploring the host range of *Fusarium tumidum*, a

candidate bioherbicide for gorse and broom in New Zealand. *In*: Program Abstracts, Xth International Symposium on Biological Control of Weeds. Pp. 121.
11- Garibaldi A., Gilardi G., and Gullino M.L. 2006. Evidence for an expanded host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. Phytoparasitica 34: 115–121.
12- Geiser D.M., del Mar Jiménez-Gasco M., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T.J., and O'donnell K. 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology 110: 473-479.
13- Hatami Moghadam Z., Gherkhlou J., De Prado R., and Sadeghi Pour H.R. 2016. Tracing wild mustard (*Sinapis arvensis*) and Turnipweed (*Rapistrum rugosum*) biotypes resistance to Tribenuron methyl herbicide in wheat fields of Golestan province and introduction a new method for determination resistant populations of these weeds. Iranian Journal of Crop Protection 30: 347-358. (In Persian with English abstract)
14- Heap I. (2014). Global perspective of herbicide-resistant weeds. Pest Management Science 70(9): 1306-1315.
15- Hirsch P.R., and Mauchline T.H. 2012. Mutualism: plant-microorganism interactions. Pp. 43-55 *In*: Ogilvie, L.A., Hirsch, P.R. (eds). Microbial Ecological Theory. Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press.
16- Iasur Kruh L., Lahav T., Abu-Nassar J., Achdari G., Salami R., Freilich S., and Aly R. 2017. Host-parasite-bacteria triangle: the microbiome of the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca* and *tomato-Solanum lycopersicum* (Mill.) as a host. Frontiers in Plant Science 8: 269.
17- Jia M., Ming Q.L., Zhang Q.Y., Chen Y., Cheng N., Wu W.W., and Qin L.P. 2014. *Gibberella moniliformis* AH13 with antitumor activity, an endophytic fungus strain producing triolein isolated from adlay (*Coix lacryma-jobi*: *Poaceae*). Current Microbiology 69: 381-387.
18- Klironomos J.N. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. Ecology 84: 2292-2301.
19- Kremer R.J. 2013. Interactions between the plants and microorganisms. Allelopathy Journal 31: 51-70.
20- Kremer R.J., and Kennedy, A.C. 1996. Rhizobacteria as biocontrol agents of weeds. Weed Technology, 10: 601-609.
21- Kroschel J., Mueller-Stoever D., Elzein A., and Sauerborn J. 2000. The development of mycoherbicides for the management of parasitic weeds of the genus Striga and Orobanche-a review and recent results. *In*: Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds. Pp. 139. Bozeman, MT: Montana State University.
22- Ladygina N., and Hedlund K. 2010. Plant species influence microbial diversity and carbon allocation in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry 42: 162-168.
23- Lakshmi V., Kumari S., Singh A., and Prabha C. 2015. Isolation and characterization of deleterious *Pseudomonas aeruginosa* KC1 from rhizospheric soils and its interaction with weed seedlings. Journal of King Saud University-Science 27(2): 113-119.
24- Leslie J.F., Summerell B.A., and Bullock S. 2006. The *Fusarium* laboratory manual (Vol. 2, No. 10). Ames, IA.
25- Lu P., Gilardi G., Gullino M.L., and Garibaldi A. 2010. Biofumigation with Brassica plants and its effect on the inoculum potential of *Fusarium* yellows of *Brassica* crops. European Journal of Plant Pathology 126: 387-402.
26- Maciá-Vicente J.G., Jansson H.B., Abdullah S.K., Descals E., Salinas J., and Lopez-Llorca L.V. 2008a. Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. FEMS Microbiology Ecology 64: 90-105.
27- Maciá-Vicente J.G., Jansson H.B., Mendgen K., and Lopez-Llorca L.V. 2008b. Colonization of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Canadian Journal of Microbiology 54: 600-609.
28- Márquez S.S., Bills G.F., and Zabalgogeazcoa I. 2007. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. Fungal Divers 27: 171-195.
29- Mendes R., Garbeva P., and Raaijmakers J.M. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS Microbiology Reviews 37: 634-663.
30- Montazeri M., Zand E., and Baghestani M.A. 2003. Weeds and their control in wheat fields of Iran. Weed Research Department of Research Institute of Pest and Diseases. 85 pp.
31- Motlagh M.R.S. 2011. *Fusarium equiseti* (Corda) Saccardo as biological control agent of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.) in rice fields. Journal of Food, Agriculture & Environment 9: 310-313.
32- Mrema E., Shimelis H., and Laing M. 2019. Combining ability of yield and yield components among *Fusarium oxysporum* f. sp. strigae-compatible and Striga-resistant sorghum genotypes. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science 1-14.
33- Nachtigal G.D.F., and Pitelli R.A. 1999. *Fusarium* sp. as a potential biocontrol agent for *Egeria densa* and *E. najas*. *In*: Program Abstracts, X International Symposium on Biological Control of Weeds. Pp. 68.
34- National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] - [cited 2017 Apr 06]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/.

35- Nazer Kakhaki S.H., Montazeri M., and Naseri B. 2017. Biocontrol of broomrape using *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* in tomato crops under field conditions. Biocontrol Science and Technology, 27: 1435-1444.
36- Park J.M., Radhakrishnan R., Kang S.M., and Lee I.J. 2015. IAA producing *Enterobacter* sp. I-3 as a potent bio-herbicide candidate for weed control: a special reference with lettuce growth inhibition. Indian Journal of Microbiology 55: 207-212.
37- Payedar S., Zand E., Baghestani M.A., and Jamali M.R. 2009. Investigation efficacy of native and foreign Fenoxaprop-p-ethyl for controlling wild Oat (*Avena ludoviciana*). Iranian Journal of Weed Research 1: 45-55. (In Persian with English abstract)
38- Shirdashtzadeh M. 2014. Deleterious rhizobacteria as weed biological control agent: Development and constraints. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences 16: 561-574.
39- Sindhu S.S., Khandelwal A., Phour M., and Sehrawat A. 2018. Bioherbicidal potential of rhizosphere microorganisms for ecofriendly weed management. In Role of Rhizospheric Microbes in Soil (pp. 331-376). Springer, Singapore.
40- Tamura K., Nei M., and Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101:11030-11035.
41- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar. S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.
42- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., and Higgins D.G. 1997. The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiply sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 24: 4876–4882.
43- Tranel P.J., Gealy D.R., and Kennedy A.C. 1993. Inhibition of downy brome (*Bromus tectorum*) root growth by a phytotoxin from *Pseudomonas fluorescens* strain D7. Weed Technology 7: 134-139.
44- Van Lenteren J.C., Bolckmans K., Köhl J., Ravensberg W.J., and Urbaneja A. 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. BioControl 63: 39-59.
45- Wardle D.A., Yeates G.W., Williamson W., and Bonner K.I. 2003. The response of a three trophic level soil food web to the identity and diversity of plant species and functional groups. Oikos 102: 45-56.
46- Zand E., Baghestani M.A., Nezam Abadi N., Minbashi Moeini M., and Hadizadeh M.H. 2009. A review on the last list of herbicides and the most important weeds of Iran. Iranian Journal of Weed Research 2: 83-100. (In Persian with English abstract)
47- Zhong S., and Steffenson B.J. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. Phytopathology 91: 469-476.

Journal of Plant Protection
Vol. 35, No. 1, Spring 2021, P. 1-10

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، ص. ۱۰-۱

Morphological and Molecular Identification of *Fusarium* spp. as Root Endophytes of Spontaneous Barley (*Hordeum spontaneum*) and Turnipweed (*Rapistrum rugosum*)

F. Nooralvandi[1]- H. Alizadeh[2]*- H. Sarami[3]- Gh. Salehi Jouzani[4]
Received: 04-11-2019
Accepted: 10-04-2021

Introduction: Endophytic microorganisms are present inside plant tissues without evident disease symptoms, but they have different interactions with their host. These microorganisms have revealed a great potential to be exploited as a biological control agent of troublesome weeds. Endophytic microorganisms in association with weed roots can act as a soil application herbicide through toxin secretion. These agents in most cases do not kill target weed but instead, have an ability to suppress them noticeably, so the crop can compete with companion weeds very successfully. Unfortunately, the endophytic microorganisms of weeds are less studied and such studies is very limited. So, this experiment was conducted to study root endophytic *Fusarium* species of *Hordeum spontaneum* and *Rapistrum rugosum* as serious weeds of winter cereals of our country. *Fusarium* species are one of the most important host-specific microorganisms in the biological control program of weeds.

Material and Methods: The weeds planted in pots filled with the soil of wheat farms sampled from Alborz, Tehran, Khorasan shomali, Khuzestan, Fars, Qazvin, Kermanshah and Golestan provinces (Iran), under greenhouse condition. The plant harvested at 5–6 leaf stage, roots were cut from the crown and sliced into small pieces. Then the pieces of root were cultured on specific *Fusarium* medium, Penta chloro Nitro Benzene Peptone Agar (PPA). *Fusarium* spp. grown on the medium, sub-cultured onto the Water Agar (WA) medium. After 24-72 h hyphae tip of the isolates translocated onto the Potato Dextrose Agar (PDA) medium and let them to fully grow and pure isolates obtained. Some morphological details of the species e.g. chlamydospore formation and physical characteristics of it, color and diameter of the colony (after 72 h) were assessed according to their growth habit on PDA medium. Each species translocated onto Carnation Leaf Agar (CLA) and Synthetic Nutrient Poor Agar (SNA) mediums to evaluate other necessary morphological characteristics. Sporodochium formation and physical characteristics of macroconidia on CLA, and microconidia formation and physical characteristics of microconidia on SNA, also assessed. Isolates were identified based on molecular data that were generated for *TEF 1-α* gene, following PCR amplification as well. Pro Chromas (1.7.6 version) and Editseq (5.01 version) softwares were used to edit the sequences before further processing. Edited sequences were blasted in NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) and compared to those sequences that already existed in the database to find similarities and molecularly identification of species. Selected sequences of the study and those isolates from the database were alignment using Clustal X (version 2.1) software and finally phylogenic tree was drawn using MEGA6 (molecular evolutionary genetics analysis). And appropriate outgroup was exploited to sequences analysis. Finally, maximum composite likelihood method was used to analyze and assessment of nucleotide sequence of gene regions of different isolates. With taking into account of all these information together, we were able to identify all isolated *Fusarium* species with confidence.

Results and Discussion: *Fusarium equiseti* was the dominant species recovered in several regions, while the other *Fusarium* species were site and species-specific. *F. equiseti* was recovered from the root of *H. spontaneum* and *R. rugosum* plants cultured in the soil of Fars and Golestan. This species also recovered from the root of *H. spontaneum* and *R. rugosum* cultured in the soil of Khouzestan and Qazvin provinces respectively. In addition, *F. redolens* and *F. acutatum* were recovered from *H. spontaneum* root cultured in the soil of Khorasan Shomali and Qazvin provinces respectively. On the other side, *F. torulosum* and *F. oxysporum* were recovered from *R. rugosum* root cultured in the soil of Kermanshah and Tehran respectively. Totally 10 isolates of five different

1 and 2- Ph.D. Graduated in Weed Science and Professor at College of Agriculture and Natural Resources of University of Tehran, Karaj, respectively.
(*- Corresponding Author Email: malizade@ut.ac.ir)
3- Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources of University of Tehran, Karaj
4- Professor of Agricultural Biotechnology Research of Iran, Karaj
DOI: 10.22067/JPP.2021.32395.0

species of *Fusarium* recovered from the root of *H. spontaneum* and *R. rugosum*. It shows probably a lot of *Fusarium* species (and maybe other microorganisms) are in contact with weeds root which can be utilized as their potential biological agent, but the potential is not studied to a great extent. There are many reports that show many species of *Fusarium* are exploited as biological agents of different weed species. This is because of the host specificity of the fungus *Fusarium* which turns it to a suitable and efficient agent in the biological control program of serious hard to chemical control weeds.

Conclusion: Many grass weeds are very hard to manage with conventional methods especially chemical means. We have to look for other alternative solutions to overcome them. Biological control of weeds is a promising approach to wisely control of weeds, especially those that are very resistance prone or hardly controlled with available herbicides. Exploiting this approach needs proper and diverse control means. Microorganisms are a rich source of biological agents of weeds that less attention has been paid to them. Endophytic microorganisms of weeds are a new generation of biological agents that studies have been focused on them recently. The first step to choose an efficient agent is having a deep knowledge about what kind of species are living with them. In fact, detailed knowledge about endophytic microorganism of weeds can aid in better understanding of the nature of interactions between weed-microbe and how to exploit these as agents in weed biological control programs.

Keywords: *Fusarium equiseti*, Fungus, *TEF*, Weed, Wheat